

LUIZ DALMIR LINHARES JUNIOR

**ESTUDO DA DISSEMINAÇÃO HEMATOGENICA DE BACTÉRIAS EM
RATOS COM PERITONITE BACTERIANA SUBMETIDOS À LIMPEZA
MECÂNICA DA CAVIDADE PERITONEAL POR LAPAROTOMIA OU POR
VÍDEOLAPAROSCOPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nicolau Gregori Czezko

Co-orientador : Prof. Dr. Bertrand Millat

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

CURITIBA

1999

LUIZ DALMIR LINHARES JUNIOR

**ESTUDO DA DISSEMINAÇÃO HEMATOGÊNICA DE BACTÉRIAS EM
RATOS COM PERITONITE BACTERIANA SUBMETIDOS À LIMPEZA
MECÂNICA DA CAVIDADE PERITONEAL POR LAPAROTOMIA OU POR
VÍDEOLAPAROSCOPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nicolau Gregori Czezko

Co-orientador : Prof. Dr. Bertrand Millat

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

CURITIBA

1999

À Deus, por dar aos homens o dom de sonhar, e também as condições para realizá-los.

Aos meus pais Luiz e Suely, que sempre me incentivaram e proporcionaram a minha formação, meus agradecimentos pelo amor e educação recebidos.

À minha esposa Luciane, pelo amor, companheirismo e pela cumplicidade de tantos momentos felizes compartilhados, essa conquista também te pertence...

À minha filha Anna Carolina, por tantas alegrias e carinho com que vem preenchendo nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nicolau Gregori Czeckzo, pela amizade, por sua orientação e dedicação e correções minuciosas que muito contribuíram ao presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR, pelo auxílio na revisão geral da dissertação e pela oportunidade de obtenção do grau de mestre.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia, pelo auxílio e confiança em mim depositada sem a qual não poderia terminar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Bertrand Millat, não só por sua ajuda incansável na co-orientação deste trabalho, bem como pelo importante estímulo durante a realização do mesmo.

À Dra. Helena Jean-Pierre, que muito auxiliou na orientação e realização das técnicas laboratoriais de microbiologia.

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, pela ajuda na correção da redação das técnicas laboratoriais de microbiologia.

À Profa. Dra. Lígia Regina Klein, que muito colaborou na correção desta dissertação.

À Laura Lúcia Cogo, pela amizade e dedicação prestadas na redação desta dissertação.

À Chefia do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Medicina de Montpellier que gentilmente cedeu suas instalações para realização das técnicas microbiológicas.

À Chefia do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade de Medicina de Montpellier que gentilmente cedeu suas instalações para realização desta pesquisa.

Aos amigos e familiares que se interessaram e incentivaram a conclusão desta pesquisa.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	vi
	RESUMO.....	vii
	ABSTRACT.....	viii
	RESUME.....	ix
1	INTRODUÇÃO.....	2
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3	MATERIAL E MÉTODO.....	11
3.1	AMOSTRA.....	11
3.1.1	Pré-operatório.....	11
3.1.2	Grupos de Animais.....	11
3.2	PREPARACÃO DO INÓCULO BACTERIANO.....	12
3.2.1	Preparação e conservação das bactérias.....	13
3.2.2	Contagem de bactérias no inóculo.....	14
3.2.3	Preparação da Substância Fecal Adjuvante (SFA)	15
3.2.4	Preparação do inóculo bacteriano.....	15
3.3	Indução de peritonite.....	16
3.4	ATO OPERATÓRIO.....	17
3.4.1	Anestesia.....	17
3.4.2	Procedimento cirúrgico realizado nos animais do grupo I.....	17
3.4.3	Procedimento cirúrgico realizado nos animais do grupo II.....	21
3.5	COLETA DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS E DO LÍQUIDO PERITONEAL.....	23

3
6

18

3.5.1	Culturas das amostras de sangue e do líquido de lavagem peritoneal.....	24
3.6	MÉTODO ESTATÍSTICO.....	25
4	RESULTADOS	27
4.1	ATO OPERATÓRIO.....	27
4.2	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	29
5	DISCUSSÃO	33
5.1	DA AMOSTRA.....	33
5.2	DO INÓCULO BACTERIANO.....	33
5.3	DO ATO CIRÚRGICO.....	34
5.4	DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	35
6	CONCLUSÕES	39
	ANEXOS	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

1 Injeção intraperitoneal de inóculo polibacteriano e substância fecal adjuvante.....	16
2 Início da laparotomia.....	18
3 Exame da cavidade peritoneal após 6 horas da injeção de inóculo. Cavidade com peritonite.....	19
4 Início da limpeza mecânica da cavidade peritoneal com infusão de solução fisiológica a 37°C.....	20
5 Disposição dos trocárteres para o início da videolaparoscopia.....	21
6 Introdução da ótica de 0º de 5 mm para exame da cavidade peritoneal.....	22
7 Retirada por punção percutânea e aspiração de 0,2 ml de amostra sangüínea da veia caudal.....	24

lista de tabelas

Tom S

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar a disseminação hematogênica de bactérias em ratos com peritonite submetidos à limpeza mecânica da cavidade peritoneal por vídeolaparoscopia ou por laparotomia. Quarenta ratos *Wistars* foram induzidos à peritonite por inóculo polibacteriano através de injeção intraperitoneal. Após 6 horas de peritonite os animais foram divididos em um grupo laparotomia (n=20) e em um grupo vídeolaparoscopia (n=20) com pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 12 mmHg., em ambos os grupos foi realizada a limpeza mecânica da cavidade peritoneal com 50 ml de solução fisiológica a 0,9%. Ao final da intervenção foram retiradas amostras sangüíneas para avaliar a bacteremia. Em ambos os grupos foram detectadas espécies de bactérias aeróbicas e anaeróbica. Não houve diferença significativa na incidência de hemoculturas positivas entre os grupos. Pode-se concluir que, a vídeolaparoscopia com pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 12 mmHg., comparada à laparotomia, não agrava a disseminação hematogênica de bactérias neste modelo experimental de peritonite

ABSTRACT

This study aim to evaluate the bacteremia in rats with peritonitis underwent a peritoneal lavage either laparoscopy or laparotomy. Forty rats *wistar* were induced at peritonitis by polybacterian inoculum intraperitoneally. After 6 hours, animals were allocated in laparotomy group (n=20) and in laparoscopy group (n=20) with pneumoperitoneum at 12 mmHg. In both groups the peritoneal lavage was performed with 50ml of physiological serum at 0,9%. Blood samples were obtained at the end of intervention for microbiological analysis. In both groups aerobic and anaerobic bacteria species were detected. There was no significant statistical difference at the incidence of positive blood cultures. It concludes that laparoscopy with capnopneumoperitoneum at 12 mmHg when compared to laparotomy does not increase the bacteremia in this peritonitis animal model.

RESUME

Ce travail a le but d'évaluer le risque de bactériémie au cours du lavage péritonéale réalisé par laparotomie ou par coelioscopie chez le rat avec péritonites bactériennes. Quarante rats *wistar* ont reçu un inoculum polybactérien par voie intrapéritonéale, après 6h, les animaux ont été traités par lavage péritonéale par laparotomie (n=20) ou par coelioscopie (n=20) avec le pneumopéritoine avec CO₂ à une pression de 12 mmHg. Dans les deux groupes il a été réalisé le lavage de la cavité péritonéale avec 5.0 ml de serum physiologique. Les prélèvements sanguins ont été réalisés à la fin de l'intervention pour évaluer la présence de bactériémie. La présence de souche aérobies et anaérobies ont été détectées dans les deux groupes. Il n'y a pas eu de différences statistiques significative par rapport à l'incidence de hemocultures positives entre les groupes. On peut conclure que, chez le rat, la coelioscopie avec le pneumopéritoine à une pression de 12mmHg, ne favorise pas la bactériémie quand comparé à la laparotomie.

1 INTRODUÇÃO

MOURET, em 1987, em Lyon, na França, efetuava a primeira colecistectomia videolaparoscópica. Iniciou-se desta forma, nova era na história da cirurgia. Hoje, há mais de 10 anos do fato, há tendência em que a maioria das cirurgias convencionais sejam realizadas por via videolaparoscópica. O advento da nova técnica levou à realização de estudos clínicos que mostraram menor morbidade, menor dor no período pós-operatório, recuperação mais rápida do trânsito intestinal, abreviação do tempo de hospitalização, retorno precoce às atividades, melhor resultado cosmético e conseqüentemente, diminuição notória no custo do tratamento, em relação à cirurgia convencional (CUSHIERI, DUBOIS, e MOUIEL, 1991 ; PERISSAT, COLLET, BELLIARD, 1992). Constituiu-se desta forma, um dos maiores avanços terapêuticos pela medicina neste fim do milênio.

A cirurgia videolaparoscópica foi também proposta para o tratamento etiológico e limpeza mecânica da cavidade peritoneal em emergências abdominais associadas com peritonites secundárias tais como apendicite aguda (TATE, CHUNG e LI, 1993), úlcera péptica duodenal perfurada (MOURET, FRANÇOIS, VIGNAL, BARTH, LOMBARD-PLATET., 1990), e diverticulite cólica perfurada (O'SULLIVAN, MURPHY, NOREM, IRELAND, 1996). Porém nestes casos, por tratar-se de peritonite bacteriana, há certo resguardo referente a indicação da técnica videolaparoscópica para o tratamento da peritonite em razão de que o aumento da pressão intra-peritoneal poderia facilitar a translocação de bactérias do peritônio para a corrente sangüínea, através de canais linfáticos peritoneais (EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA, TREEN, 1996 ; BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995). Alguns dos modelos experimentais que estudaram esta hipótese relataram efeitos deletérios associados com o pneumoperitônio realizado com CO₂ (EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA, TREEN, 1996 ; BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995).

Outrossim, os modelos experimentais que abordam o assunto, são, controversos; uma vez que, nas pesquisas, o desencadeamento de peritonite está associado à laparotomia (BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995; IPEK, PAKSOY, COLAK, POLAT, UYGUN, 1998 ; DUGUE, FRITSCH, FELTEN, GOSSOT, COLOMER, CELERIER, LAGRANGE, REVILLON, 1995), o inóculo bacteriano utilizado para indução da peritonite foi formado somente por *Escherichia coli*, sem substâncias adjuvantes (OZGUÇ, YILMAZLAR, ZORLUOGLU, GEDIKOGLU, KAYA, 1996), o tempo de evolução de peritonite é de uma hora (JACOBI, ORDEMANN, BÖHM, ZIEREN, VOLK, LORENZ, HALLE, MÜLLER, 1997 e GURTNER, ROBERTSON, CHUNG, LING, IP, LI, 1995), não foi realizado nenhum procedimento terapêutico associado ao pneumoperitônio, como, por exemplo, limpeza mecânica da cavidade peritoneal (JACOBI, ORDEMANN, BÖHM, ZIEREN, VOLK, LORENZ, HALLE, MÜLLER, 1997), e, enfim, as conseqüências da inoculação de bactérias intra-peritoneal não foram comparadas entre grupos de laparotomia e laparoscopia (EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA, TREEN, 1996 ; BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995; DUGUE, FRITSCH, FELTEN, GOSSOT, COLOMER, CELERIER, LAGRANGE, REVILLON, 1995).

A análise da literatura consultada definiu a formulação da questão que, posteriormente, deu origem ao presente trabalho: quais serão os resultados das hemoculturas em animais com peritonite quando submetidos à cirurgia convencional (laparotomia) ou à cirurgia videolaparoscópica (vídeo-cirurgia)?

O objetivo desse estudo, é avaliar a disseminação hematogênica de bactérias em ratos com peritonite bacteriana, induzida por inóculo polibacteriano, submetidos comparativamente à limpeza mecânica da cavidade peritoneal por laparotomia e por videolaparoscopia.

apud 2
conclusão 1 ?

2 REVISÃO DA LITERATURA

Em 1995, GURTNER, ROBERTSON, CHUNG, LING, IP, e LI utilizam o coelho (New Zealand) como modelo experimental de peritonite bacteriana causada por inóculo de *Escherichia coli* com 10^9 unidades formadoras de colônias (c.f.u.) para comparar a influência do pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 12 mmHg em relação à laparotomia. Neste experimento, concluiu-se que, comparativamente com a laparotomia, o pneumoperitônio com CO₂ na referida pressão não aumenta a bacteremia ou a endotoxemia ; não aumenta as respostas fisiológicas (pressão arterial e batimento cardíaco, temperatura corporal, pressão arterial de oxigênio e de gás carbônico, e o potencial de hidrogênio), nem, tampouco, os resultados laboratoriais (hemocultura e endotoxina plasmática) da sépsis.

Ainda em 1995, BLOECHLE, EMMERMANN, TREU, MACK, ZORNIG, e BROELSCH, mediante estudo randomizado utilizando ratos (Wistar) como modelo experimental de peritonite induzida por perfuração de úlcera gástrica, estudaram os efeitos do pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 4 mmHg, comparado-os com o grupo controle (sem pneumoperitônio). Neste estudo não existiu grupo de laparotomia e também não foi realizado o tratamento da perfuração da úlcera gástrica. Concluiu-se que após 12 horas houve peritonite mais severa, além de maior porcentagem do número de culturas sangüíneas positivas e de Swabs abdominal no grupo de pneumoperitônio.

DUGUE, FRITSCH, FELTEN, GOSSOT, COLOMER, CELERIER, LAGRANGE e REVILLON, também em 1995, publicaram estudo realizado em 40 ratos (Wistar). Os animais foram induzidos à peritonite causada por ileotomia (de 5mm realizada na borda antimesentérica). Após 24 horas, foram divididos em 2 grupos com 20 animais cada. O grupo I recebeu pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 6 mmHg, pelo período de uma hora, sendo, então, realizada punção intracardiaca para obtenção de amostra sangüínea para realização de hemocultura. O grupo II não foi submetido ao

pneumoperitônio, mas a mesma punção para amostra sangüínea foi realizada após 25 horas de peritonite.

Os resultados deste estudo não apresentaram diferença significativa de porcentagem de hemoculturas positivas entre os grupos. Conclui-se que o pneumoperitônio à referida pressão, não aumenta a disseminação hematogênica de bactérias de sépsis intraperitoneal em ratos *Wistars*.

Em 1996, OZGUÇ, YILMAZLAR, ZORLUOGLU, GEDIKOGLU e KAYA utilizaram 24 coelhos machos adultos, New Zealand para estudar os efeitos do pneumoperitônio com CO₂ em relação à bacteremia, em peritonite bacteriana desencadeada por suspensão contendo 10⁹ unidades formadoras de colônias (u.f.c.) de *Escherichia coli*. Neste trabalho, os animais foram divididos em três grupos (contendo 8 coelhos). O grupo-controle (I) só recebeu o inóculo bacteriano intraperitoneal; o grupo II, que após 2hs da inoculação foi submetido ao pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 15 mmHg por uma hora; o grupo III, após 2 horas da inoculação foi submetido à laparotomia, ficando a cavidade abdominal exposta ao ar ambiente por uma hora, antes de ser realizada a síntese. Em todos os grupos foram realizadas duas hemoculturas, as quais ocorreram na terceira e na sexta hora após o desencadeamento da peritonite. Neste estudo em que não houve diferença estatística nas culturas sangüíneas, concluiu-se que o pneumoperitônio, à referida pressão, em peritonite experimental causada por *Escherichia coli*, não apresenta bacteremia aumentada comparativamente àquela apresentada pelo grupo-controle e pelo grupo submetido à laparotomia.

EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA e TREEN, também em 1996, utilizaram 60 ratos (Sprague-Dawley) para estudar a translocação bacteriana na existência de um pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 15 mmHg, dividiram os animais em 3 grupos I, II e III. Cada grupo, por sua vez, foi subdividido em subgrupos a e b, donde resultou grupo Ia e Ib, grupo IIa e IIb e grupo IIIa e IIIb. Os grupos foram submetidos a procedimentos diversos, como segue: o Grupo I não

foi inoculado, mas, a seguir, dividido em subgrupos a e b, o primeiro (Ia) não teve pneumoperitônio; enquanto o segundo (Ib) o teve. O Grupo II foi inoculado com suspensão contendo 10^6 (u.f.c.) de *Escherichia coli*; destes, o subgrupo IIa não teve pneumoperitônio, enquanto este procedimento ocorreu com o grupo IIb. O grupo III teve inóculo bacteriano intraperitoneal numa concentração de 10^8 (u.f.c.) de *Escherichia coli*, sendo que o subgrupo IIIa não foi submetido ao pneumoperitônio e o subgrupo IIIb o foi. As hemoculturas foram realizadas em todos os grupos e subgrupos a cada 15 minutos, num tempo total de 180 minutos. Durante esse tempo o batimento cardíaco e a pressão arterial eram monitorizados.

Neste estudo, onde não houve comparação com grupo de laparotomia, observou-se que os animais submetidos ao pneumoperitônio tiveram maior porcentagem de hemoculturas positivas em todo o intervalo de tempo estudado, em comparação com o seu grupo controle, os quais apresentaram valor de p menor que 0,001, sendo que o germe isolado foi somente a *Escherichia coli*. Conclui-se, portanto, que o pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 15 mmHg aumenta a translocação bacteriana de *Escherichia coli* do peritônio para a circulação sanguínea em ratos.

JACOBI, ORDRMANN, BÖHM, VOLK, LORENZ, HALLE e MÜELLER, em 1997, utilizaram 60 ratos Wistars para avaliar se a pressão intra-abdominal elevada aumenta a bacteremia em peritonite bacteriana causada por inóculo fecal humano. Para testar tal hipótese, os autores realizaram o seguinte estudo: após uma hora da introdução do inóculo fecal em cavidade abdominal, os ratos foram randomizados em 3 grupos com 20 animais cada. Um grupo controle que não teve manipulação na cavidade abdominal; um segundo grupo no qual foi realizado pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 10 mmHg por 30 min, e um terceiro grupo no qual foi realizado laparotomia mediana de 10 cm com exposição da cavidade abdominal por trinta minutos. Retirou-se amostras sanguíneas de todos os grupos, em dois momentos, sendo o primeiro em 1 hora e o outro em 7 dias após a intervenção, para efetuar hemoculturas. Em três momentos, 1 hora, 2 dias e 7 dias após a intervenção,

retirou-se amostras sanguíneas para dosagem de endotoxina plasmática. Após uma semana os ratos foram sacrificados para a observação do número de abscessos e realização de cultura dos mesmos.

Os autores observaram que o pneumoperitônio inicialmente aumenta a incidência de hemoculturas positivas comparadas ao grupo controle. Porém não houve aumento da endotoxemia e desenvolvimento de abscessos intra-abdominais no grupo pneumoperitônio, comparado ao grupo controle. Entretanto, verificou-se que a laparotomia provocou aumento da translocação de espécies aeróbicas e anaeróbicas, endotoxemia e desenvolvimento de abscessos intraperitoneais, comparativamente ao grupo pneumoperitônio e ao grupo controle. Do experimento, concluiu-se que o pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 10 mmHg não aumenta a bacteremia e a formação de abscessos intra-peritoneais, relativamente aos resultados observados com a ocorrência da laparotomia.

BLOECHLE, EMMERMANN, STRATE, SCHEURLLEN, SCHNEIDER, ACHILLES, WOLF, MACK, ZORNIG, e BROELSCH, em 1998, mediante estudo randomizado para comparar os riscos relativos às complicações sépticas associadas com videolaparoscopia e laparotomia utilizaram porcos (Duroc) como modelo experimental de peritonite induzida por perfuração gástrica. Após, 6 ou 12 horas de evolução de peritonite, os animais foram tratados com sutura da perfuração gástrica por videolaparoscopia com pneumoperitônio à pressão de 12mmHg, (grupo I) e por laparotomia (grupo II). Neste estudo, observou-se que a videolaparoscopia apresentou efeitos deletérios em animais tratados com 12 horas de evolução de peritonite comparados à laparotomia, concluíram que a videolaparoscopia associada à peritonite com 12 horas de evolução pode ser arriscada, necessitando de indicação criteriosa.

IPEK, PAKSOY, COLAK, POLAT, e UYGUN, em 1998, publicaram estudo realizado em 60 ratos (Sprague-Dawley) para avaliar os efeitos do pneumoperitônio na bacteremia e na severidade da peritonite. Os animais foram induzidos à peritonite

por cecostomia (de 2mm) e divididos em 2 grupos com 30 ratos cada. Após 1 hora (10 animais), 3 horas (10 animais) e 6 horas (10 animais) nos ratos do grupo I, foi realizado pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 4 a 5 mmHg durante 30 minutos. No grupo II (controle) nenhum procedimento foi realizado. No fim do experimento todos os animais foram submetidos à laparotomia mediana e esternotomia para retirada de amostras sanguíneas via punção cardíaca e coleta de Swabs peritoneais para realização de estudo microbiológico. Biópsia peritoneal de todos os quadrantes, do fígado, do rim direito e do baço, foram analisados histopatologicamente. Neste estudo, onde não existiu grupo laparotomia e nem tampouco tratamento da peritonite, o pneumoperitônio agravou a bacteremia quando o tempo de evolução de peritonite foi de até 3 horas. No entanto, após 6 horas de evolução de peritonite, não houve aumento da bacteremia. Conclui-se que a cirurgia videolaparoscópica é tão segura quanto a cirurgia aberta no tratamento de peritonite aguda com 6 horas de evolução.

3 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade de Medicina de Montpellier, França.

Aplicaram-se as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1996). Utilizou-se a Nômina Anatômica Veterinária (1983). Aplicaram-se as normas para referências bibliográficas e abreviaturas de títulos e periódicos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR-6023) de 1989.

3.1 AMOSTRA

Utilizaram-se 40 ratos Wistar machos, pesando entre 277 à 390 gramas, com peso médio 327,94 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Laboratório IFFA CREDO, L'Arbresle, França.

3.1.1 Pré-operatório

Os animais foram aclimatados por dez dias em condições padrão do Laboratório, com temperatura entre 20 à 24°C, umidade relativa do ar de 50 à 60%, 12 horas com e 12 horas sem luz. Foram mantidos em caixas coletivas de alumínio, contendo 5 ratos em cada caixa, com livre acesso à ração para ratos e água *ad libitum*. Neste período, os animais foram observados clinicamente quanto ao seu estado de saúde.

3.1.2 Grupos de Animais

Após o período de pré-operatório, os animais foram distribuídos em dois grupos formados por 20 ratos cada. O Grupo I (observações de 01 a 20) foi definido

como grupo Laparotomia (controle) e o Grupo II (observações de 21 a 40) como grupo videolaparoscopia (experimentação).

Nos animais do Grupo I, o procedimento foi: indução à peritonite por inóculo bacteriano e, após 6 horas, laparotomia para limpeza mecânica da cavidade peritoneal com solução fisiológica (0,9% de cloreto de sódio) a 37°C. Nos ratos do Grupo II, após 6 horas da indução de peritonite por inóculo bacteriano, foi realizada a limpeza mecânica peritoneal com solução fisiológica (0,9% de cloreto de sódio) a 37°C, por cirurgia videolaparoscópica.

3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

O Inóculo bacteriano foi constituído por três bactérias misturadas à suspensão estéril de fezes do rato e sulfato de bário. As três bactérias foram: *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

Essas três bactérias foram isoladas de paciente com peritonite, identificadas e conservadas por congelação a -80°C em infusão de coração e cérebro (Brain Heart Infusion – BHI, bioMérieux®), suplementada com glicerina a 10%, em tubos cryobank.

Para a preparação de inóculo, as cepas eram re-isoladas em meio sólido, e, após, repicadas em meio líquido e congeladas.

A mistura das três cepas, destinadas à injeção, era preparada a partir de alíquotas descongeladas e quantificadas em unidade formadora de colônia, de maneira a obter concentração definida de bactérias.

3.2.1 Preparação e conservação das bactérias

As três cepas foram descongeladas e isoladas em ágar nutriente escolhido em função das exigências nutritivas das bactérias.

A *Escherichia coli* foi semeada sobre ágar Mac Conkey (bioMérieux®), e incubadas por 18 horas em temperatura a 37°C.

O *Enterococcus faecalis* foi semeado em meio Columbia enriquecido com sangue de carneiro e ácido nalidíxico 15µg/ml (bioMérieux®), e incubadas por 18 horas a 37°C.

O *Bacteroides fragilis* foi semeado em meio Columbia enriquecido com sangue de carneiro e incubada por 48 horas sob atmosfera anaeróbica. A anaerobiose era realizada em jarra com geradores de CO₂ (Oxoid Unipath).

A partir das culturas obtidas, foram semeadas 2 colônias de *Escherichia coli* e de *Enterococcus faecalis* separadamente em 10 ml de infusão de coração e cérebro (BHI) – (bio Mérieux®) e incubadas por 18 horas a 37°C e 7 colônias de *Bacteroides fragilis*, em 10 ml de BHI (bio Mérieux®) e incubadas por 48 horas a 37°C.

As suspensões bacterianas eram suplementadas em glicerinas a 10%, separadas em alíquotas de 1,5ml, em tubos Cryobank, e congeladas a temperatura de - 80°C.

3.2.2 Contagem de bactérias no inóculo

O conteúdo bacteriano das alíquotas do inóculo foi quantificado mediante diluições sucessivas de fator 10 em solução fisiológica a 0,9%, da seguinte forma: pipetou-se, com pipeta automática Gilson®, 100µl do conteúdo do inóculo, sendo distribuído em tubos de plástico contendo 900µl de solução fisiológica a 0,9%, esterilizada. Este procedimento foi repetido sucessivamente em outros 7 tubos até obter a diluição 10^{-2} .

Para a contagem de *Escherichia coli*, 100µl das diluições 10^{-2} até 10^{-8} foram semeadas em Agar Mac Conkey (bio Mérieux®).

Para a contagem de *Enterococcus faecalis* procedeu-se como descrito anteriormente, desta vez utilizando-se o Agar de Columbia com sangue de carneiro suplementado com Ac. Nalidíxico 15µg/ml. (bio Mérieux®).

Para a contagem de *Bacteroides fragilis*, 100µl das diluições 10^{-2} até 10^{-8} foram semeadas em Agar de Columbia com sangue de carneiro (bio Mérieux®).

Após 24 horas de incubação as colônias eram contadas nas placas de Petri que apresentavam crescimento de 30 a 300 colônias. As contagens das colônias bacterianas foram efetuadas regularmente antes e após o congelamento.

3.2.3 Preparação da Substância Fecal Adjuvante (SFA)

Optou-se pela utilização de Substância Fecal Adjuvante adicionada ao inóculo bacteriano com o objetivo de aumentar a toxicidade do inóculo e auxiliar o desenvolvimento de peritonite.

Pesaram-se 500g de fezes de rato, recém emitidas, e homogeneizaram-se em 500ml de caldo de BHI - Brain Heart Infusion, (bio-Mérieux). Filtrou-se esta suspensão através de gaze estéril e adicionou-se 1000ml de suspensão de sulfato de bário a 10% (peso/volume). Deu-se o nome, a esta suspensão, de Substância Fecal Adjuvante (SFA) e a mesma foi dividida em frascos de vidro de 10ml, autoclavada por 15 minutos a 121°C e conservada a - 20° C (freezer-Fagor®)

3.2.4 Preparação do inóculo bacteriano

No dia da inoculação as alíquotas de bactérias foram descongeladas e pipetava-se um volume determinado das suspensões de cada uma das cepas de bactérias, sendo-lhe adicionado igual volume de SFA, de maneira a obter as concentrações bacterianas de 10^6 u. f. c. para *Escherichia coli*, 10^7 u. f. c. para *Enterococcus faecalis* e 10^6 u. f. c. para *Bacteroides fragilis*. Esta mistura constituiu o inóculo bacteriano final e o mesmo era submetido a contagem de bactérias por diluições como descrito no item 3.2.2., exceto que aqui, para a contagem do *Bacteroides fragilis*, utilizou-se o meio de cultura seletivo Schaedler com sangue de carneiro suplementado com Neomicina 7,5µg/ml e com Vancomicina 7,5 µg/ml. Esta contagem do inóculo bacteriano final foi realizada também 150 minutos após sua preparação, objetivando levar em conta o tempo de transporte e da inoculação.

3.3 Indução de peritonite

Os animais eram apreendidos pelo dorso, com a mão direita, e pela cauda, com a mão esquerda do técnico. Com o animal imobilizado, o abdômen era degermado com álcool isopropílico a 90%. Era aplicado 1 ml do inóculo bacteriano, por injeção intraperitoneal em quadrante inferior direito do abdômen (figura 1). Após esta manipulação, os animais permaneciam em caixas individuais de polipropileno, por 6 horas. Este período foi cronometrado em cada animal dos grupos I e II. Neste período ficavam em jejum.

Figura 1 – Injeção intraperitoneal de inóculo polibacteriano e substância fecal adjuvante.



3.4 ATO OPERATÓRIO

3.4.1 Anestesia

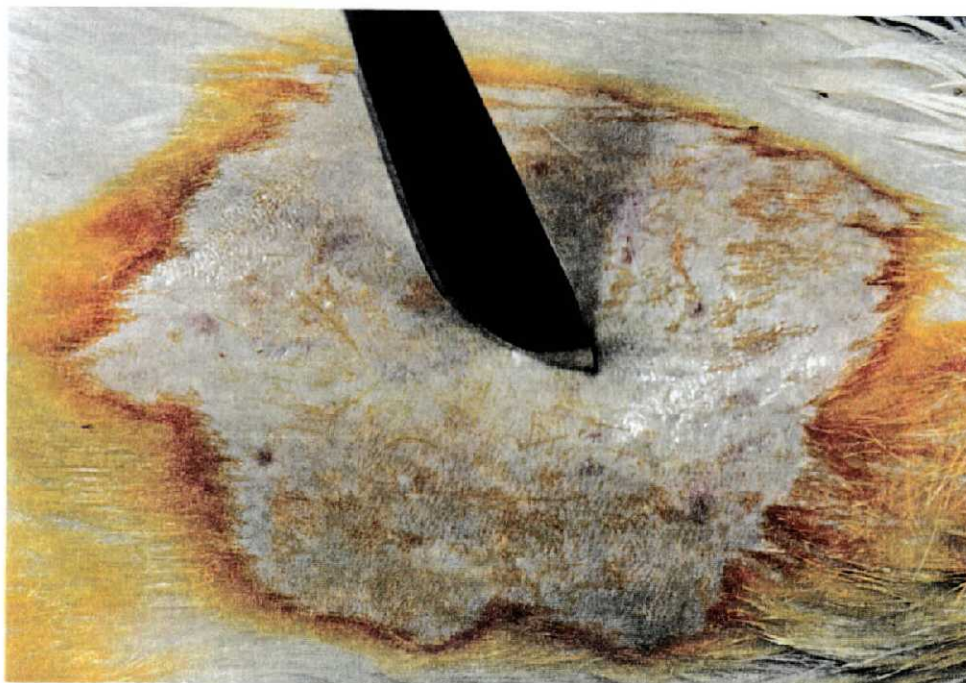
A indução anestésica dos animais foi realizada com uma solução contendo xylazina (Rompun ®, Bayer) e ketamina (Ketalar®, Roche), na dose de 10mg por Kg/peso, e 50 mg por Kg/peso respectivamente, mediante injeção intramuscular aplicada no membro inferior direito após anti-sepsia da região com álcool isopropílico à 90%. Após a indução anestésica, o animal era mantido numa caixa individual de polipropileno por 15 minutos quando atingia o plano de anestesia. Durante o experimento, os animais permaneceram em respiração espontânea e não houve necessidade de complementação da anestesia. Após a aplicação da anestesia, os animais eram pesados, a região abdominal ventral tricotomizada, e imobilizados com fita adesiva numa prancha de madeira, em decúbito dorsal. A área abdominal era limpa com solução aquosa de P.V.P.I. a 10% (Betadine ®). O campo operatório era delimitado com campos cirúrgicos fenestrados estéreis.

3.4.2 Procedimento cirúrgico realizado nos animais do grupo I

Nos animais do grupo I procedeu-se :

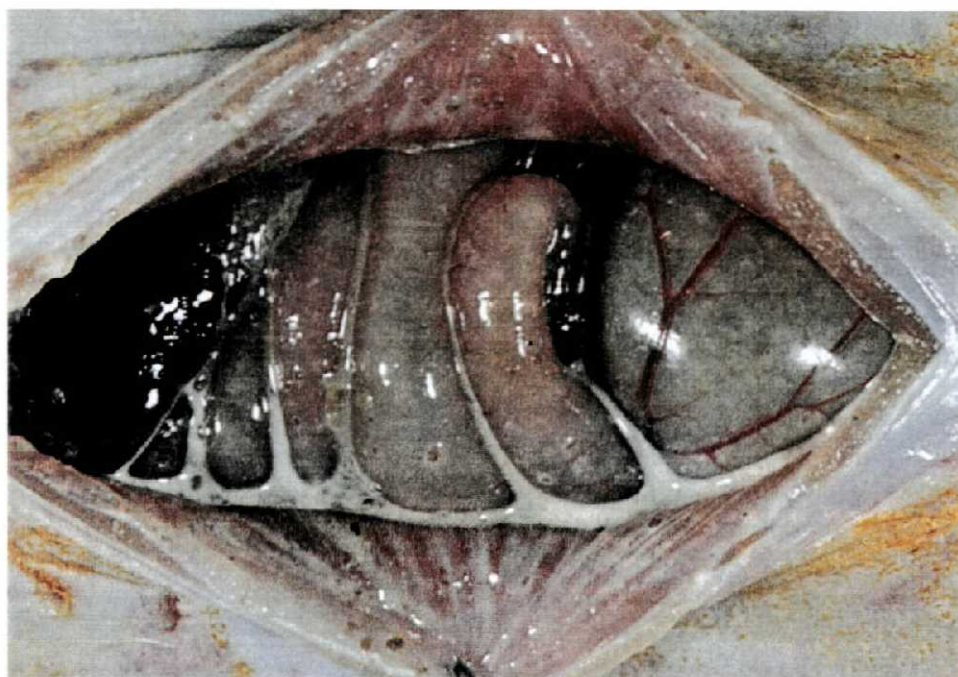
a) Laparotomia com incisão mediana, com início ao nível do apêndice xifóide e término à 0,5 cm abaixo da cicatriz umbilical e abertura da cavidade peritoneal (figura 2).

Figura 2 – Início da Laparotomia.



b) Exame da cavidade peritoneal (figura 3). Este exame consistia em classificar os aspectos das vísceras abdominais como normal – vísceras brilhantes sem edema e sem líquido na cavidade, e peritoníticas- presença de edema nas alças intestinais, líquido seroso e/ou purulento com presença do sulfato de bário e opacificação do omento maior.

Figura 3 – Exame da cavidade peritoneal após 6 horas da injeção do inóculo. Cavidade com peritonite.



c) Limpeza mecânica da cavidade peritoneal (figura 4). Dez ml de solução fisiológica a 0.9% a temperatura de 37°C foram instilados na cavidade peritoneal, através de uma seringa descartável (Becton-Dickinson®, Plastipak®) de 10 ml. As vísceras abdominais eram mobilizadas cuidadosamente, dois ml do líquido de limpeza mecânica da cavidade peritoneal eram retirados com seringa e injetados num frasco destinado à cultura de microrganismos (BBL SEPTI-CHEK – Becton-Dickinson® Europe), o qual era enviado para análise bacteriológica. Repetia-se a limpeza mecânica da cavidade peritoneal por volumes sucessivos de 10 ml até completar um volume total de 50 ml.

Figura 4 – Início da limpeza mecânica da cavidade peritoneal com infusão de solução fisiológica a 37°C.



d) Síntese da parede abdominal. Após a limpeza mecânica da cavidade peritoneal procedia-se à síntese da parede abdominal por sutura contínua da linha alba, e da pele com fio de poligalactina (Vicryl 3-0). Imediatamente após o término da intervenção, uma punção da veia caudal era realizada para retirada de 0,2ml de sangue, que eram injetados em frasco destinado à cultura de microrganismos (BBL SEPTI-CHEK – Becton-Dickinson® Europe), e enviado para análise bacteriológica.

e) Após o experimento os animais foram mortos por super-dosagem inalatória em câmpnula com éter sulfúrico.

Os atos operatórios referentes a limpeza mecânica da cavidade peritoneal, e duração da cirurgia (desde a incisão até a síntese) foram cronometrados e após analisados.

3.4.3 Procedimento cirúrgico realizado nos animais do grupo II

Nos animais do grupo II os procedimentos foram os seguintes:

a) Introdução dos trocárteres e realização do pneumoperitônio (figura 5). Incisão mediana supra-umbilical em 0,5 cm da pele e do tecido celular subcutâneo iniciando à 0,5 cm da cicatriz umbilical. Dissecção medial e incisão da linha alba e do peritônio. Introdução de um trocárter com diâmetro de 5 mm, sob visão direta. Um segundo trocárter laparoscópico, com diâmetro de 5 mm, era introduzido no hipocôndrio esquerdo, sob visão direta, através de incisão transversal de 0,5cm subcostal, há 4 cm da linha média. Uma sutura contínua em bolsa em volta dos trocárteres laparoscópicos era confeccionada com fio de poligalactina (Vicryl 3-0, Ethicon®), para evitar o vazamento gasoso do pneumoperitônio. Insuflação de CO₂ com aparelho insuflador Olympus®, até a pressão de 12 mmHg. Através do trocárter medial era introduzida uma ótica de 0° com diâmetro de 5 mm, marca Olympus® (figura 6), e do trocárter lateral era introduzido uma sonda de irrigação e aspiração.

Figura 5 – Disposição dos trocárteres para o início da videolaparoscopia.

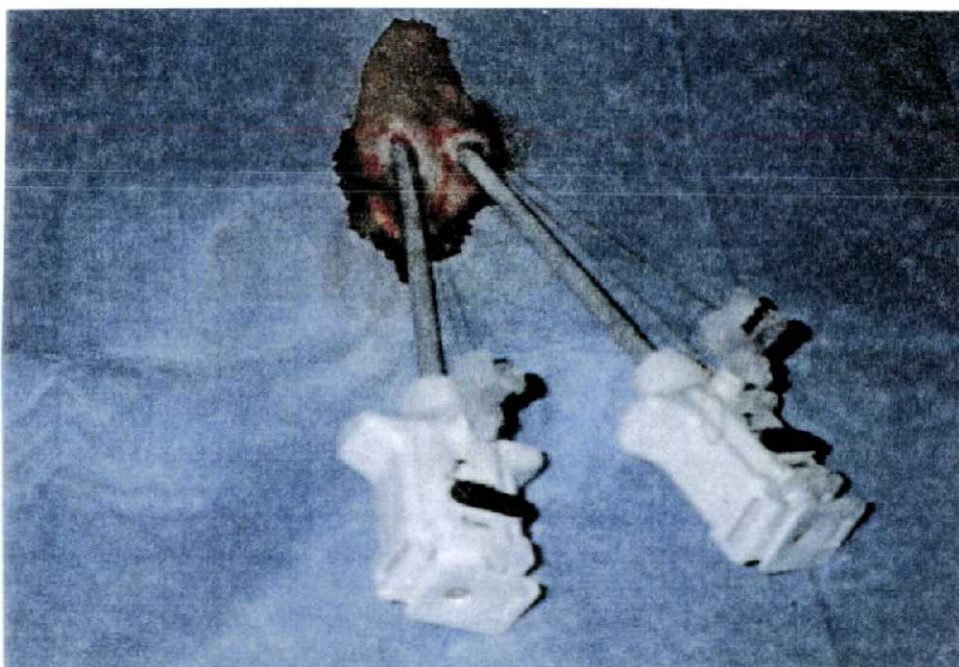
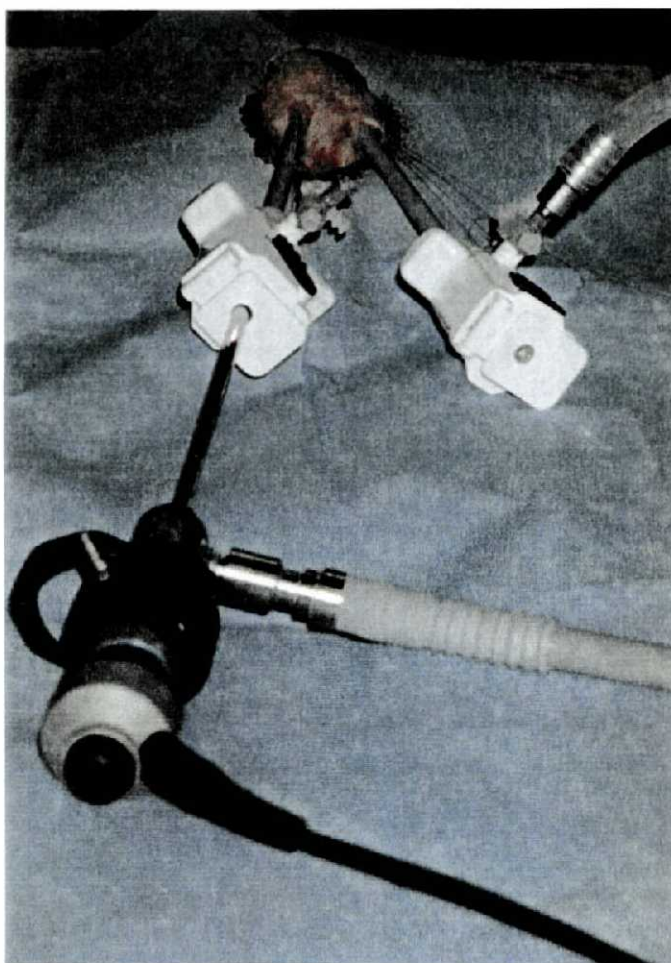


Figura 6 – Introdução da ótica de 0° de 5 mm para exame da cavidade peritoneal.



b) O pneumoperitônio era mantido a uma pressão de 12 mmHg pelo insuflador automático, conectado no trocárter medial através de uma cânula.

c) Com a visualização da cavidade peritoneal pelo monitor (Sony®) realizava-se exame da mesma conforme descrito no item 3.4.2 b, posteriormente procedia-se limpeza mecânica da cavidade peritoneal com a introdução de 10 ml de solução fisiológica a 0,9% a temperatura de 37°C infundidos lentamente através de seringa descartável de 10 ml (Becton-Dickinson®, Plastipak®) pela sonda de irrigação. As vísceras abdominais eram mobilizadas cuidadosamente com a extremidade da sonda e, após, 2 ml eram retirados com seringa, via sonda, e injetados em frasco destinado à cultura de microrganismos (BBL SEPTI-CHEK – Becton-Dickinson® Europe), o qual

era enviado para análise bacteriológica. O restante do soro era aspirado pela sonda conectado a um recipiente fechado. Este procedimento era repetido em volumes sucessivos de 10 ml até completar um volume total de 50 ml.

d) Ao término da limpeza mecânica da cavidade peritoneal abria-se a válvula do trocárter para saída do CO₂.

e) Retirava-se a sonda de irrigação e aspiração, a ótica e seus respectivos trocárteres por tração lenta e contínua.

f) Realizava-se a síntese das incisões da parede abdominal em 2 planos: a aponeurose em ponto único, e a pele em sutura intradérmica mediante fio de poligalactina (Vicryl3-0).

g) Após o experimento os animais foram mortos por super-dosagem inalatória em campânula com éter sulfúrico.

Os atos operatórios referentes a limpeza mecânica da cavidade peritoneal, e duração da cirurgia (desde a incisão até a síntese) foram cronometrados e após analisados.

3.5 COLETA DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS E DO LÍQUIDO DE LIMPEZA MECÂNICA DA CAVIDADE PERITONEAL

Em todos os animais procedia-se a retirada de 2ml de líquido da limpeza mecânica da cavidade peritoneal, como descrito nos itens 3.4.2 c) e 3.4.3 c); e 0,2ml de sangue da veia caudal por aspiração por meio de punção com agulha e seringa de insulina, (B-D®) logo após o procedimento cirúrgico (figura 7). Transferiu-se, as amostras do líquido de limpeza mecânica da cavidade peritoneal e de sangue

para um frasco destinado à cultura de microrganismos (BBL SEPTI-CHEK – Becton-Dickinson® Europe), o qual foi enviado para análise bacteriológica.

Figura 7 – Retirada por punção percutânea de aspiração de 0,2 ml de amostra sangüínea da veia caudal.



3.5.1 Culturas das amostras de sangue e do líquido de limpeza mecânica da cavidade peritoneal.

Incubaram-se as amostras sangüíneas e do líquido de limpeza mecânica da cavidade peritoneal, contidas num frasco destinado à cultura anaeróbica de microrganismos de uso pediátrico (BBL SEPTI-CHEK – Becton-Dickinson® Europe), a temperatura de 37°C, por 48 horas. Após este tempo de incubação as amostras foram semeadas em ágar Mac Conkey incubadas em aerobiose ; em ágar de Columbia enriquecido com sangue de carneiro e suplementado com ácido nalidíxico 15µg/ml incubado em atmosfera contendo 5% de CO₂ ; e em ágar Columbia enriquecido com sangue de carneiro e em ágar Schaedler com sangue de carneiro suplementado com

Neomicina 7,5µg/ml e com Vancomicina 7,5 µg/ml, incubados em anaerobiose. A anaerobiose era realizada em jarra com geradores de CO₂ (Oxoid Unipath). Após 24 horas, 48 horas e 5 dias (para os anaeróbios) as diferentes colônias foram identificadas por intermédio de sistemas de galerias Api (bio- Mérieux®) :- galeria Api 20 E para *Escherichia coli*, galeria ID 32 Strep para *Enterococcus faecalis* e galeria Api 20 A para *Bacteroides fragilis*.

3.6 Método Estatístico

Para a análise estatística comparativa dos grupos, utilizou-se o teste Exato de Fisher e o teste "t" de Student, com um limite de confiança de 95% ($p=0,05$), (BOX, 1978 ; WALPOLE, 1978).

4 RESULTADOS

4.1 ATO OPERATÓRIO

O ato operatório transcorreu livre de intercorrências em todos os animais. O tempo médio de duração da peritonite foi de $363,7 \pm 13$ minutos e de $369,95 \pm 3,74$ minutos para os grupos I e II respectivamente. A análise estatística realizada por meio do teste "t" de Student, verificou-se não haver diferença significativa entre os grupos, $p=0,091741$.

O tempo médio de duração das intervenções cirúrgicas realizadas nos animais dos grupos I e II foi de $30,85 \pm 4,45$ minutos e $46,4 \pm 6,3$ minutos, respectivamente. A comparação dos grupos, utilizando-se o teste acima mencionado, mostrou que a duração média das cirurgias foi maior no grupo II, $p<0,0001$ (ver tabela 1).

O tempo médio da limpeza mecânica da cavidade peritoneal foi menor para o Grupo I ($10,25 \pm 2,5$ minutos) em comparação com o Grupo II ($15,05 \pm 3,6$ minutos) $p=0,00032$.

Os volumes coletados da limpeza mecânica da cavidade peritoneal para o Grupo I e para o Grupo II foi de $45,92 \pm 2,6$ ml e $45,47 \pm 3,9$ ml respectivamente. Não existiu diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, $p>0,05$. ($p=0,5085$).

Todos os animais tiveram a cavidade peritoneal classificadas como peritonítica.

Tabela 1 - Duração do ato operatório nos animais dos Grupos I e II com o respectivo valor de p.

Grupo	n	Tempo de cirurgia em minutos (M \pm EP)	p
I	20	30,85 \pm 0,99	<0,0001
II	20	46,4 \pm 1,41	

n = número de animais

M = Média

EP = Erro Padrão

Tabela 2 - Duração da Limpeza Mecânica da Cavidade Peritoneal nos animais dos Grupos I e II com o respectivo valor de p.

Grupo	n	Tempo de L P (em minutos) (M \pm EP)	p
I	20	10,25 \pm 0,57	0,00032
II	20	15,05 \pm 0,80	

n = número de animais

LP = Limpeza mecânica da cavidade Peritoneal

M = média

EP = erro padrão

4.2. DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas quantitativas realizadas para a contagem de bactérias no inóculo estão apresentadas na tabela 3:

Tabela 3 - Resultado da quantificação de bactérias do inóculo bacteriano

Bactéria	t1	t2
<i>Escherichia coli</i>	$3,0 \times 10^6$ u.f.c	$3,4 \times 10^6$ u.f.c
<i>Enterococcus faecalis</i>	$1,5 \times 10^7$ u.f.c.	$2,5 \times 10^7$ u.f.c.
<i>Bacteroides fragilis</i>	$7,4 \times 10^6$ u.f.c.	$7,0 \times 10^6$ u.f.c.

t1= quantificação do inóculo inicial

t2= quantificação do inóculo após 150 min.

As análises microbiológicas qualitativas realizadas nas amostras do líquido de limpeza mecânica da cavidade peritoneal e sangüíneas detectaram somente as 3 bactérias inoculadas.

Tabela 3- Distribuição dos animais dos grupos I e II e resultado das hemoculturas com o respectivo valor de p.

Bactéria estudada	Cultura	Grupo I	Grupo II	p
<i>Escherichia coli</i>	+	20	19	1,0000
	-	0	1	
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	7	2	0,1274
	-	13	18	
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	8	4	0,3008
	-	12	16	

+ = cultura positiva

- = cultura negativa

Tabela 4 - Distribuição dos animais dos grupos I e II e resultado da cultura do Líquido de Limpeza Mecânica da Cavidade Peritoneal com o respectivo valor de p.

Bactéria estudada	Cultura	Grupo I	Grupo II	p
<i>Escherichia coli</i>	+	20	20	
	-	0	0	
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	20	19	1.0000
	-	0	1	
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	20	18	0,4872
	-	4	2	

+ = cultura positiva

- = cultura negativa

5 DISCUSSÃO

5.1 DA AMOSTRA

De acordo com a literatura médica consultada, tanto animais de grande e médio porte como, cães, porcos e coelhos; quanto os de pequeno porte como, ratos, são utilizados para estudo científico em vídeo cirurgia (BOHM e MILSON, 1994; VOLZ, KÖSTER, WEIS, SCHMIDT, URBASCHEK, MELCHERT, ALBRECHT, 1996; OZGUÇ, YILMAZLAR, ZORLUOGLU, GEDIKOGLU, KAYA, 1996; SCHLECHTER, MARKS, SHILINGSTAD, 1994; BERGUER, GUTT e STIEGMANN, 1993; BOUVY, MARQUET, HAMMING, JEEKEL, BONJER, 1996).

Neste experimento optou-se pela utilização do rato (*Rattus norvegicus*), por ser um animal de fácil manejo, baixo custo e também por ser muito utilizado nesta linha de pesquisa, (BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995; EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA, TREEN, 1996; JACOBI, ORDEMANN, BÖHM, ZIEREN, VOLK, LORENZ, HALLE, MÜELLER, 1997; IPEK, PAKSOY, COLAK, POLAT, UYGUN, 1998), além de permitir uma amostra suficiente para uma análise estatística.

5.2 DO INÓCULO BACTERIANO.

Em nosso modelo experimental, a peritonite foi originada com inóculo polimicrobiano, com espécies aeróbicas e anaeróbica, similar ao espectro bacteriano de pacientes com peritonite secundária (PACELLI, DOGLIETTO, ALFIERI, PICCIONI, SGADARI, GUI, CRUCITTI, 1996; GUIBERT, 1995; HAU, 1990). A substância fecal adjuvante (fezes e bário) foi adicionada às bactérias pois auxilia o desenvolvimento de peritonite experimental (ODERDONK, 1976). O sulfato de bário e as fezes do rato aumentam a toxicidade do inóculo (WICHTERMAN, BAUE, CHAUDRY, 1979), por aumentar a resposta inflamatória do peritônio e por diminuir o clareamento peritoneal espontâneo das bactérias (MONTRAVERS, MAULIN, 1995). Além do mais,

o bário foi efetivo como marcador para assegurar que o inóculo estava localizado na cavidade intra-peritoneal, evitando desta forma resultados falso-positivos. Com este modelo de inóculo polibacteriano tentou-se criar um modelo de peritonite experimental o mais próximo possível ao observado na clínica diária.

5.3 DO ATO CIRÚRGICO

A cirurgia videolaparoscópica em ratos, tem sido utilizada como treinamento e como objeto de pesquisas. (BERGUER, GUTT e STIEGMANN, 1993 e BOUVY, MARQUET, HAMMING, JEEKEL, BONJER, 1996). Em treinamento, a criação do pneumoperitônio à pressão de 6mmHg em ratos é suficiente para obter tensão parietal semelhante a obtida em humanos (DUGUE, FRITSCH, FELTEN, GOSSOT, COLOMER, CELERIER, LAGRANGE, REVILLON, 1995). Procedimentos cirúrgicos foram realizados, com pneumoperitônio à pressão de 10 mmHg, em ratos. (BERGUER, GUTT e STIEGMANN, 1993).

Em estudos para avaliar a disseminação bacteriana hematogênica em ratos, a pressão do pneumoperitônio variou entre 4 a 15 mmHg. (BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995; DUGUE, FRITSCH, FELTEN, GOSSOT, COLOMER, CELERIER, LAGRANGE, REVILLON, 1995; EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA, TREEN, 1996; JACOBI, ORDEMANN, BÖHM, ZIEREN, VOLK, LORENZ, HALLE, MÜELLER, 1997). Neste trabalho optou-se em utilizar a pressão de pneumoperitônio a 12mmHg seguindo o protocolo de pesquisa da Faculdade de Medicina de Montpellier.

Devido a metodologia aplicada, o pneumoperitônio foi mantido de maneira intermitente e sua duração foi proporcional ao tempo de realização da limpeza mecânica da cavidade peritoneal, outros estudos o realizaram de modo contínuo e prolongado, porém sem a realização de procedimento cirúrgico. (BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995; DUGUE, FRITSCH, FELTEN, GOSSOT, COLOMER, CELERIER, LAGRANGE, REVILLON, 1995; EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA,

TREEN, 1996; JACOBI, ORDEMANN, BÖHM, ZIEREN, VOLK, LORENZ, HALLE, MÜELLER, 1997).

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao volume de líquido aspirado da limpeza mecânica da cavidade peritoneal. Não encontrou-se na literatura consultada, estudo comparativo entre laparotomia e videolaparoscopia referente a limpeza mecânica da cavidade peritoneal em ratos com peritonite bacteriana.

5.4 DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Neste estudo experimental de peritonite em que foi utilizado inóculo bacteriano similar às condições clínicas, a frequência de hemoculturas positivas para *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* e *Enterococcus faecalis* não foi estatisticamente significativa quando comparadas entre o Grupo I (Laparotomia) e o Grupo II (Videolaparoscopia).

Estudos sobre o peritônio diafragmático realizados em animais de laboratório (coelho e ratos), e o conhecimento de sua estrutura histológica nomeada "stomata", (ALLEN e VOGT, 1937 ; TSILIBARY e WISSIG, 1983), levaram à melhor compreensão da absorção dos fluídos peritoneais. Estas "stomatas" são poros cujo diâmetro é modulável, isto é, em situações tais como hiper-pressão abdominal, inflamação intra-abdominal e relaxamento do músculo diafragma, seus diâmetros são aumentados, conseqüentemente há aumento de absorção do fluído peritoneal, que via ducto torácico alcança a circulação sangüínea. Este mecanismo foi forte argumento contra a utilização da cirurgia videolaparoscópica para tratamento de pacientes com peritonite secundária devido à possibilidade teórica de um agravamento do estado séptico pelo pneumoperitônio. Esta teoria foi confirmada por EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA, TREEN, (1996), em estudo experimental de peritonite,

mostraram que a insuflação de CO₂ dentro da cavidade peritoneal à pressão de 15 mmHg induzia ao aumento da incidência de translocação bacteriana de *Escherichia coli* do peritônio para a circulação sangüínea. Aplicações desse e de outros estudos experimentais para a situação clínica são no entanto, controversas, pois os grupos com pneumoperitônio não foram comparados a grupos com laparotomia (EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA, TREEN, 1996 ; BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995 ; DUGUE, FRITSCH, FELTEN, GOSSOT, COLOMER, CELERIER, LAGRANGE, REVILLON, 1995), o modelo de peritonite experimental utilizou somente *Escherichia coli* (OZGUÇ, YILMAZLAR, ZORLUOGLU, GEDIKOGLU, KAYA, 1996), ou o desencadeamento de peritonite está associado à violação da cavidade peritoneal por laparotomia (BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995; IPEK, PAKSOY, COLAK, POLAT, UYGUN, 1998), e, por último, nenhuma medida terapêutica foi realizada, particularmente limpeza mecânica da cavidade peritoneal que poderia aumentar a pressão intra-abdominal (DUGUE, FRITSCH, FELTEN, GOSSOT, COLOMER, CELERIER, LAGRANGE, REVILLON, 1995 ; BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995; EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA, TREEN, 1996; OZGUÇ, YILMAZLAR, ZORLUOGLU, GEDIKOGLU, KAYA, 1996 ; JACOBI, ORDEMANN, BÖHM, ZIEREN, VOLK, LORENZ, HALLE, MÜELLER, 1997 ; IPEK, PAKSOY, COLAK, POLAT, UYGUN, 1998).

No presente estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos para bacteremia por *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* e *Enterococcus faecalis*. Estes resultados concordam com os trabalhos experimentais de GURTNER, ROBERTSON, CHUNG, LING, IP, LI. (1995) e OZGUÇ, YILMAZLAR, ZORLUOGLU, GEDIKOGLU, KAYA, (1996), onde não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas incidências de hemoculturas positivas para *Escherichia coli* entre os grupos de Laparotomia e Laparoscopia. No entanto *Bacteroides fragilis* e *Enterococcus faecalis* não foram estudadas naqueles trabalhos experimentais.

Estudos que concluem por um aumento de bacteremia associado com laparoscopia são controversos uma vez que são firmados em comparações entre

Grupo Laparoscopia e Grupo Controle, sem comparação com um Grupo de Laparotomia (EVASOVICH, CLARK, HORATTAS, HOLDA, TREEN, 1996; BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995; IPEK, PAKSOY, COLAK, POLAT, UYGUN, 1998), ou, ainda, uma violação da cavidade abdominal está associada à criação da peritonite (BLOECH, EMMERMANN, TREU, 1995; IPEK, PAKSOY, COLAK, POLAT, UYGUN, 1998).

Ao contrário, nosso estudo não demonstra que a videolaparoscopia pode ter efeitos deletérios no manejo de peritonites secundárias quando comparado à cirurgia por laparotomia (convencional).

Aplicação destes resultados para a prática clínica é especulativa. A peritonite secundária é responsável por uma alto índice de morbidade e mortalidade (WHITMANN, 1990 ; BORGONOVO, AMATO, VARALDO, MATTIOLI, 1995), e o tempo de evolução até o tratamento cirúrgico é dos mais importantes fatores prognósticos (BOHNEN, BOULANGER, MEAKINS, MacLEAN, 1983 ; KHOSROVANI, KOHEN, GUIBERTEAU, LE NELL, 1994), principalmente em pacientes idosos (KUNIN, et al., 1991). Além do mais, interesse teórico da videolaparoscopia no tratamento da peritonite secundária consiste em evitar a morbidade de incisão mediana ampla em pacientes com abdômen contaminado (MILLAT e GUILLON, 1995). BENOIT, CRUAUD, LAUROY, BOUTELIER, CHAMPAULT, (1995), em ensaio clínico prospectivo não encontraram diferenças na incidência de hemoculturas positivas e morbidades séptica entre laparotomia e videolaparoscopia. NAVEZ, TASSETTI, SCOHY, MUTTER, GUIOT, EVRARD, MARESCAUX, (1998), mediante série de 231 pacientes com peritonite secundária conclui que a videolaparoscopia não aumenta taxa de mortalidade no manejo de peritonite aguda, e nos pacientes com suspeição clínica de peritonite a videolaparoscopia pode evitar de 5 a 10% de laparotomias desnecessárias. Neste estudo experimental não encontrou-se argumentos contra o uso da videolaparoscopia no tratamento da peritonite secundária. Contudo, ainda são necessárias mais avaliações experimentais e clínicas que possam esclarecer o lugar da videolaparoscopia no manejo de infecções intra-abdominal agudas.

6 CONCLUSÕES

1. O inóculo polibacteriano causou disseminação hematogênica em todos os animais.
2. Não houve diferença significativa referente à incidência de hemoculturas positivas entre os grupos animais de laparotomia e videolaparoscopia submetidos à limpeza mecânica da cavidade peritoneal.

ANEXO 1

GRUPO I		Hemocultura				Lavagem Peritoneal			
n	peso	t-p	V.R.L.M.	t-j	t-i	E.C.	E.F.	B.F.	B.F.
1	378	385	40	15	25	+	+	+	+
2	390	375	42	10	30	+	+	+	+
3	360	365	46	15	40	+	+	+	+
4	350	349	47,5	15	35	+	+	+	+
5	370	356	46	12	39	+	+	+	+
6	288	376	43	10	29	+	+	+	+
7	277	388	47	10	30	+	+	+	+
8	296	363	46	13	29	+	+	+	+
9	294	360	48	9	30	+	+	+	+
10	314	351	47	7	29	+	+	+	+
11	314	362	45	10	25	+	+	+	+
12	326	353	42	7	30	+	+	+	+
13	332	360	48	7	40	+	+	+	+
14	318	340	49	9	33	+	+	+	+
15	345	354	43	10	29	+	+	+	+
16	320	368	46	10	28	+	+	+	+
17	308	382	49	8	29	+	+	+	+
18	323	361	48	8	26	+	+	+	+
19	335	351	49	10	31	+	+	+	+
20	328	375	47	10	30	+	+	+	+
MEDIA		363,7	45,925	10,25	30,85				

nº = número do rato

t-p = tempo de evolução de peritonite

V.R.L.M.= Volume Recuperado da Limpeza Mecânica da cavidade peritoneal

t-i = tempo de lavagem peritoneal

t-i = tempo de intervenção cirúrgica

E.C.= *Escherichia coli*

E.F.= *Enterococcus faecalis*

B.F.= *Bacteroides fragilis*

+ = Presença da bactéria

- = Ausência da bactéria

GRUPO II		Hemocultura					Lavagem Peritoneal				
n	peso	t-p	V.R.L.M.	t-l	t-i	E.C.	E.F.	B.F.	E.C.	E.F.	B.F.
1	334	362	37	12	40	+	-	+	+	-	+
2	359	365	40	22	62	+	+	+	+	+	+
3	359	380	40	25	40	+	-	+	+	+	+
4	326	371	47	14	49	+	-	-	+	+	+
5	345	363	45	15	42	+	-	-	+	+	+
6	346	359	44	15	42	+	-	-	+	+	+
7	352	369	50	17	50	+	-	-	+	+	+
8	329	380	45	11	47	+	-	-	+	+	+
9	359	359	48	14	57	+	-	-	+	+	+
10	348	383	49	14	50	+	+	-	+	+	+
11	349	383	45	15	35	+	-	-	+	+	-
12	356	372	45	15	43	+	-	-	+	+	-
13	363	366	44	11	44	+	-	-	+	+	+
14	353	372	56	12	46	+	-	-	+	+	+
15	330	369	43,5	20	49	+	-	-	+	+	+
16	328	370	47	12	45	+	-	-	+	+	+
17	349	383	45	15	55	+	-	-	+	+	+
18	319	359	47	15	43	+	-	-	+	+	+
19	355	357	45	12	43	+	-	-	+	+	+
20	330	377	47	15	46	+	-	+	+	+	+
MEDIA	344,45	369,95	45,475	15,05	46,4						

nº = número do rato

t-p = tempo de evolução de peritonite

V.R.L.M. = Volume Recuperado da Limpeza Mecânica da cavidade peritoneal

t-l = tempo de lavagem peritoneal

t-i = tempo de intervenção cirúrgica

E.C. = *Escherichia coli*E.F. = *Enterococcus faecalis*B.F. = *Bacteroides fragilis*

+ = Presença da bactéria

- = Ausência da bactéria

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, L.; VOGT, B. A mechanism of lymphatic absorption from serous cavities. **Am. J. Physiol.**, v.119, p.776-782, 1937.
- BENOIT, J.; CRUAUD, P.; LAUROY, J.; BOUTELIER, P.; CHAMPAULT, G. Les traitement laparoscopique des infections abdominales génère-t-il les bactériémies? Etude prospective: 75 cas. **J. Chir.**, v.132(12), p.472-477, 1995.
- BERGUER, R.; GUTT, C.; STIEGMANN, G.V. Laparoscopy surgery in the rat: Description of a new technique. **Surg. Endosc.**, New York, v.7, p.345-347, 1993.
- BLOECH C.; EMMERMANN A.; TREU H.; et al. Effect of a pneumoperitoneum on the extent and severity of peritonitis induced by gastric ulcer perforation in the rat. **Surgical Endoscopy**, v.9, p.898-901, 1995.
- BLOECHLE, C.; EMMERMANN, A.; STRATE, T.; SCHEURLLEN, U.J.; SCHNEIDER, C.; ACHILLES, E.; WOLF, M.; MACK, D.; ZORNIG, C.; BROELSCH, C.E. Laparoscopic vs open repair of gastric perforation and abdominal lavage of associated peritonitis in pigs. **Surg. Endosc.**, v.12, p.212-218, 1998.
- BOHM, J. W.; MILSON, M. Animal models as educational tools in laparoscopic colorectal surgery. **Surg. Endosc.**, New York, v.8, p.707-713, 1994.
- BOHNEN, J.; BOULANGER, M.; MEAKINS, J.L.; MacLEAN, A.P.H. Prognosis in Generalized Peritonitis. **Arch. Surg.**, march v.118, p.285-290, 1983.
- BORGONOVO, G.; AMATO, E. VARALDO, F. P. MATTIOLI.- Epidemiology of peritonitis. **Med. Mal. Inf.**, v.25 special, p.13-19, 1995.
- BOUVY, N.D.; MARQUET, R.L.; HAMMING, J.F.; JEEKEL, J.; BONJER, H.J. Laparoscopy surgery in the rat. **Surg. Endosc.**, New York, v.10, p.490-494, 1996.
- BOX, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. New York : **Wiley**, 1978.
- CUSHIERI, A.; DUBOIS, F.. MOUIEL, J. et al. The european experience with laparoscopic cholecistectomy. **Am. J. Surg.**, Newton, v.161, p.385-392, 1991.
- DUGUE, L; FRITSCH, S.; FELTEN, A.; GOSSOT, D.; COLOMER, S.; CELERIER, M.; LAGRANGE, P.H.; REVILLON, Y. Effets de l'insufflation intra-péritonéale sur la dissémination hématogène des infections abdominales. **Ann. Chir.**, v.49 n°5 p.423-426, 1995.

- EVASOVICH M. R.; CLARK T.C.; HORATTAS M. C.; HOLDA S.; TREEN L. Does pneumoperitoneum during laparoscopy increase bacterial translocation ? **Surg. Endosc.**, v.10, p.1176-1179, 1996.
- GUIBERT, M. La bactériologie des péritonites. **Med. Mal. Infec.**, v.25 special p.42-53, 1995.
- GURTNER, G.C.; ROBERTSON, C.S.; CHUNG, S.C.S.; LING, T.K.W.; IP, S.M.; LI, A.K.C. Effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on bacteremia and endotoxaemia in an animal model of peritonitis. **Br. J. Surg.**, v.82, p.844-848, 1995.
- HAU, T. Bacteria, Toxins, and the Peritoneum. **World J. Surg.**, mar./apr., v.14(2), p.167-175, 1990.
- IPEK, T. PAKSOY, M.; COLAK, T.; POLAT, E.; UYGUN, N. Effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on bacteremia and severity of peritonitis in an experimental model. **Surg Endosc.**, v.12, p.432-435, 1998.
- JACOBI, C.A.; ORDEMANN, J.; BÖHM, B.; ZIEREN, H. U.; VOLK, H.D.; LORENZ, W.; HALLE, E.; MÜLLER, J.M. Does laparoscopy increase bacteremia and endotoxemia in a peritonitis model ? **Surg Endosc.**, v.11, p.235-238, 1997.
- KUNIN, N.; BANSARD, J.Y.; LETOQUART, J.P.; CHARETON, B.; LEBOIS, E.; LA GRAMMA, A.; MAMBRINI, A. Facteurs pronostiques des péritonites du sujet âgé. **J. Chirurgie**, v.128 (11), p.481-486, 1991.
- KHOSROVANI, C.; KOHEN, M.; GUIBERTEAU, B.; LE NELL, J.C. Perforations des ulcères duodéno-pyloriques. Facteurs pronostiques et choix thérapeutiques. **Ann. Chir.**, v.48(4), p.345-349, 1994.
- MILLAT, B.; GUILLON, F. Traitement chirurgical des péritonites. **Med. Mal. Inf.**, v.25 special, p.134-143, 1995.
- MONTRAVERS, P.; MAULIN, L. Choix de l'antibiothérapie des péritonites: données expérimentales. **Med. Mal. Inf.**, v.25 special, p.121-126, 1995.
- MOURET P.; FRANCOIS Y.; VIGNAL J.; BARTH X.; LOMBARD-PLATET R. Laparoscopic treatment of perforated peptic ulcer. **Br. J. Surg.**, v.77, p.1006, 1990.
- MOURET, P. From the first laparoscopic cholecystectomy to the frontiers of laparoscopic surgery. **Digest. Surg.**, New York, v.8, p.124-125, 1991.
- NAVEZ, B.; TASSETTI, V.; SCOHY, J.J.; MUTTER. D.; GUIOT. P.; EVRARD, S.; MARESCAUX, J. Laparoscopic management of acute peritonitis. **Br. J. Surg.**, v.85, p.32-36, 1998.

- ODERDONK, A.B.; BARTLETT, J.G.; LOUIE, T.; SULLIVAN-SEIGLER, N.; GORBACH, S.L. Microbial Synergy in Experimental Intra-Abdominal Abscess. **Infect. Immun.**, jan., v.13(1), p.22-26, 1976.
- O'SULLIVAN G. C.; MURPHY D.; NOREM R.F.; IRELAND A. Laparoscopic management of generalized peritonitis due to perforated colic diverticula. **American Journal of Surgery**, n.171, p.432-434, 1996.
- OZGUÇ, H.; YILMAZLAR, T.; ZORLUOĞLU, A.; GEDIKOĞLU, S.; KAYA, E.. Effect of CO2 Pneumoperitoneum on Bacteremia in Experimental Peritonitis. **Eur. Surg. Res.**, v.28, p.124-129, 1996.
- PACELLI, F.; DOGLIETTO, G.B.; ALFIERI, S.; PICCIONI, E.; SGADARI, A.; GUI, D.; CRUCITTI, F. Prognosis in Intra-abdominal Infections. **Arch Surg.**, june, v.131, p.641-645, 1996.
- PERISSAT, J.; COLLET, D.; BELLIARD, R. et al. Laparoscopic cholecystectomy: The state of art. A report on 700 consecutive cases. **World J. Surg.**, New York, v.16, p.1074-1082, 1992.
- SCHLECHTER, B.; MARKS, J.; SHILINGSTAD, R.B. et al. Intra-abdominal mesh prosthesis in a canine model. **Surg. Endosc.**, New York, v.8, p.127-129, 1994.
- TATE J. J. T.; CHUNG S. C. S.; LI A. C. K. Laparoscopic appendicectomy : a two-handed technique. **Br. J. Surg.**, v.80, p.764, 1993.
- INTERNATIONAL ANATOMICAL TERMINOLOGY. **Federative Committee on Anatomical Terminology**. Ed. Thieme Stuttgart – New York 1983.
- TSILIBARY, E.C.; WISSIG, S.L. Lymphatic absorption from the peritoneal cavity: Regulation of Patency of Mesothelial Stomata. **Microvasc. Res.**, v.25, p.22-39, 1983.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de trabalhos**. 6 ed. Curitiba : Ed. da UFPR, 196. 8v.
- VOLZ, J. ; KÖSTER, S. ; WEIS , M.; SCHMIDT, R.; URBASCHEK, R. MELCHERT, F.; ALBRECHT, M. Pathophysiologic features of a pneumoperitoneum at laparoscopy: A swine model. **Am. J. Obst. Gynecol.**, v.174, p.132-140, 1996.
- WALPOLE, R.E.; MEYERS, R.H. Probability and statistics for engineers and scientists. New York : **Macmillan**, 1978.

WICHTERMAN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRY, I.H. Sepsis and Septic Shock- A Review of Laboratory Models and a Proposal. **J. Surg. Res.**, august, v.29, p.189-208, 1980.

WITTMANN, D.H. Intra-abdominal Infections **World J. Surg.**, mar./apr., v.14(2), p.145-147, 1993.